

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
12 septembre 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/069922 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : A61K 7/13,  
7/06

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/00704

(22) Date de dépôt international :  
27 février 2002 (27.02.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/02972 5 mars 2001 (05.03.2001) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
L'OREAL [FR/FR]; 14, rue Royale, F-75008 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) :  
BERNARD, Anne-laure [FR/FR]; 1 rue Molière, F-92400 Courbevoie (FR). NICOLAS MORGANTINI, Luc [FR/FR]; 5, rue du Vignet, F-60810 Rully (FR). BI-ATRY, Bruno [FR/FR]; 16-18 avenue de la République, F-94300 Vincennes (FR). SIMONNET, Jean-Thierry [FR/FR]; 24, rue Léon-Frot, F-75011 Paris (FR).

(74) Mandataire : BUREAU D.A.CASALONGA JOSSE; 8, avenue Percier, F-75008 Paris (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MICROCAPSULES WITH AQUEOUS CORE CONTAINING OXIDATION-REDUCTION ENZYMES AND THEIR USE IN OXIDATION DYEING COMPOSITIONS

(54) Titre : MICROCAPSULES A COEUR AQUEUX CONTENANT DES ENZYMES D'OXYDO-RÉDUCTION ET LEUR UTILISATION DANS DES COMPOSITIONS DE TEINTURE D'OXYDATION

(57) Abstract: The invention concerns microcapsules with aqueous core containing at least an oxidation-reduction enzyme selected among the oxidoreductases with 2 electrons, the oxidoreductases with 4 electrons and the peroxidases, and with a polymer coating consisting of at least a polymer selected among polycaprolactone, poly(3-hydroxybutyrate), poly(ethylene adipate), poly(butylene adipate), cellulose esters and at least a C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> carboxylic acid, styrene and maleic anhydride copolymers, styrene and acrylic acid copolymers, styrene-ethylene/butylene-styrene block terpolymers, styrene-ethylene/propylene-styrene block terpolymers, and ethylene, vinyl acetate and maleic anhydride terpolymers. The invention also concerns a method for preparing said microcapsules and oxidation dyeing compositions containing same.

(57) Abrégé : L'invention concerne des microcapsules à coeur aqueux contenant au moins une enzyme d'oxydo-réduction choisie parmi les oxydo-reductases à 2 électrons, les oxydo-réductases à 4 électrons et les peroxydases, et à enveloppe polymérique constituée d'au moins un polymère choisi parmi la polycaprolactone, le poly(3-hydroxybutyrate), le poly(éthylène adipate), le poly(butylène adipate), les esters de cellulose et d'au moins un acide carboxylique en C<sub>1-4</sub>, les copolymères de styrène et d'anhydride maléique, les copolymères de styrène et d'acide acrylique, les terpolymères séquencés styrène-éthylène/butylène-styrène, les terpolymères séquencés styrène-éthylène/propylène-styrène, et les terpolymères d'éthylène, d'acétate de vinyle et d'anhydride maléique, un procédé de préparation de ces microcapsules ainsi que des compositions de teinture d'oxydation les contenant.

WO 02/069922 A1

**Microcapsules à coeur aqueux contenant des enzymes  
d'oxydo-réduction et leur utilisation dans des compositions de  
teinture d'oxydation**

5

La présente invention concerne des microcapsules à cœur aqueux contenant, dans une enveloppe polymérique, au moins une enzyme d'oxydo-réduction, un procédé de préparation de ces microcapsules ainsi que des compositions de teinture d'oxydation les contenant.

10

L'utilisation d'enzymes d'oxydo-réduction à la place d'agents oxydants chimiques tels que le peroxyde d'hydrogène en teinture d'oxydation des fibres kératiniques est connue depuis longtemps. Elle présente pour principal avantage de permettre une coloration des fibres dans des conditions plus douces et de préserver la structure des fibres kératiniques.

15

La teinture d'oxydation par voie enzymatique présente cependant un certain nombre de problèmes. En effet, l'enzyme a tendance à s'adsorber sur le substrat kératinique et de ne pas s'éliminer totalement lors du rinçage ce qui peut poser des problèmes d'innocuité.

20

Certains colorants ou précurseurs de colorants peuvent inhiber ou désactiver l'enzyme et diminuer ainsi l'intensité et la qualité des colorations obtenues. Par ailleurs, les enzymes, qui sont des molécules biologiques complexes, sont sensibles à certains facteurs de leur environnement proche et en particulier à la chaleur.

25

La demanderesse a découvert qu'il était possible de résoudre les problèmes décrits ci-dessus en encapsulant les enzymes d'oxydo-réduction utilisées couramment en teinture d'oxydation dans des microcapsules particulières à cœur aqueux et à enveloppe polymérique.

30

La présente invention a par conséquent pour objet des microcapsules à enveloppe polymérique dont la composition sera décrite plus en détail ci-après, et à cœur aqueux contenant au moins une enzyme d'oxydo-réduction choisie

parmi les oxydo-reductases à 2 électrons, les oxydo-réductases à 4 électrons et les peroxydases.

5 L'invention a également pour objet des microcapsules anhydres obtenues par déshydratation des microcapsules à cœur aqueux ci-dessus.

10 L'invention a encore pour objet un procédé de préparation de ces microcapsules à enveloppe polymérique et à cœur aqueux contenant au moins une enzyme d'oxydo-réduction choisie parmi les oxydo-reductases à 2 électrons, les oxydo-réductases à 4 électrons et les peroxydases, par émulsification multiple.

15 L'invention a en outre pour objet des compositions de teinture d'oxydation des fibres kératiniques telles que les cheveux, contenant, dans un milieu physiologiquement acceptable,

- a) au moins un précurseur de colorant d'oxydation choisi parmi les bases d'oxydation et/ou les coupleurs, et
  - b) des microcapsules à enveloppe polymérique dont la composition sera décrite plus en détail ci-après, et à cœur aqueux contenant au moins une enzyme d'oxydo-réduction choisie parmi les oxydo-reductases à 2 électrons, les oxydo-réductases à 4 électrons et les peroxydases.
- 20

25 L'invention a encore pour objet un kit de teinture d'oxydation multicomposants comprenant au moins un premier composant contenant les microcapsules à cœur aqueux et à enveloppe polymérique décrites ci-dessus, et au moins un deuxième composant contenant au moins un précurseur de colorant d'oxydation choisi parmi les bases d'oxydation et/ou les coupleurs, les deux composants étant conservés séparément et étant destinés à être mélangés l'un avec l'autre immédiatement avant application sur les fibres kératiniques.

30

L'invention a également pour objet un procédé de teinture des fibres kératiniques et en particulier des cheveux, utilisant les compositions de teinture d'oxydation ou le kit de teinture d'oxydation décrits ci-dessus.

L'encapsulation de l'enzyme a pour effet premier la séparation physique entre l'enzyme et le substrat biologique tel que les cheveux et le cuir chevelu. Cette séparation empêche l'adsorption des enzymes, améliore l'efficacité du rinçage et accroît l'innocuité du système. L'isolement de l'enzyme évite également l'inhibition de celle-ci par certains colorants.

La demanderesse a constaté par ailleurs que l'encapsulation de l'enzyme d'oxydo-réduction permettait de diminuer considérablement l'inactivation de celle-ci par la chaleur. En effet, la stabilité de l'enzyme encapsulée, conservée à une température comprise entre 25 et 45 °C, est en moyenne environ 2 fois plus importante que celle de la même enzyme non encapsulée conservée dans les mêmes conditions de température.

Le procédé de préparation des microcapsules de la présente invention donne d'excellents taux d'encapsulation de l'enzyme. En effet, le taux d'encapsulation, défini comme le rapport de la quantité d'enzyme retrouvée à l'intérieur des microcapsules à la quantité totale d'enzyme utilisée, est généralement supérieur ou égal à 90 %.

Un autre avantage des microcapsules de la présente invention est l'irréversibilité de l'encapsulation des enzymes d'oxydo-réduction. En effet, ces dernières, du fait de leur grande masse moléculaire, ne peuvent pas traverser l'enveloppe polymérique des microcapsules et ne sont par conséquent pas libérées dans le milieu extérieur de la composition de teinture d'oxydation. La demanderesse a constaté par ailleurs que même le séchage (par exemple par lyophilisation) suivi de la redispersion des microcapsules ne provoquait pas de relargage des enzymes encapsulées.

L'enveloppe polymérique des microcapsules de la présente invention est donc capable de retenir efficacement les protéines tout en laissant passer, par diffusion, des molécules de faible poids moléculaire tels que l'oxygène ou le peroxyde d'oxygène dissous dans le milieu aqueux extérieur et/ou intérieur. Cette perméabilité sélective de l'enveloppe, essentielle pour l'utilisation des enzymes d'oxydo-réduction encapsulées en teinture d'oxydation des cheveux, peut être attribuée au caractère modérément hydrophobe des polymères utilisés qui sont, certes, insolubles dans l'eau mais ne constituent pas une barrière

parfaitement étanche à la phase aqueuse et aux solutés de faible masse qu'elle contient.

L'enveloppe des microcapsules de la présente invention est constituée d'au moins un polymère choisi parmi

- 5       • la polycaprolactone,
- le poly(3-hydroxybutyrate),
- le poly(éthylène adipate),
- le poly(butylène adipate),
- 10       • les esters de cellulose et d'au moins un acide carboxylique en C<sub>1-4</sub>, tels que l'acétate de cellulose, le propionate de cellulose et le butyrate de cellulose, de préférence des esters de cellulose mixtes de deux types d'acides carboxyliques, tels que l'acétoprionate de cellulose ou l'acétobutyrate de cellulose,
- les copolymères de styrène et d'anhydride maléique,
- 15       • les copolymères de styrène et d'acide acrylique,
- les terpolymères séquencés styrène-éthylène/butylène-styrène,
- les terpolymères séquencés styrène-éthylène/propylène-styrène, et
- les terpolymères d'éthylène, d'acétate de vinyle et d'anhydride maléique.

20       La ou les enzymes d'oxydo-réduction encapsulée(s) dans le cœur aqueux des microcapsules de la présente invention, sont choisies parmi

- les oxydo-reductases à 2 électrons,
- les oxydo-réductases à 4 électrons et
- 25       • les peroxydases.

25       La ou les oxydo-réductases à 2 électrons encapsulées selon la présente invention sont notamment choisies parmi les pyranose oxydases, les glucose oxydases, les glycérol oxydases, les lactate oxydases, les pyruvate oxydases, les uricases, les choline oxydases, les sarcosine oxydases, les bilirubine oxydases et les aminoacides oxydases.

30       Les oxydo-réductases à 2 électrons encapsulées sont choisies de préférence parmi les uricases d'origine animale, microbiologique ou biotechnologique.

A titre d'exemple, on peut citer l'uricase extraite de foie de sanglier, l'uricase d'*Arthrobacter globiformis*, ainsi que l'uricase d'*Aspergillus flavus*.

5 La ou les oxydo-réductases à 2 électrons peuvent être utilisées sous forme cristalline pure ou sous une forme diluée dans un diluant inerte pour ladite oxydo-réductase à 2 électrons.

10 Chaque oxydo-réductase à 2 électrons a besoin, pour pouvoir catalyser la réaction d'oxydation de l'oxygène en  $H_2O_2$ , de la présence d'un donneur pour ladite enzyme.

Selon l'invention, on entend par donneur les différents substrats également nécessaires au fonctionnement de ladite ou desdites oxydo-réductases à 2 électrons.

15 La nature du donneur pour ladite enzyme varie en fonction de la nature de l'oxydo-réductase à 2 électrons qui est utilisée. Par exemple, à titre de donneur pour les pyranose oxydases, on peut citer le D-glucose, le L-sorbose et le D-xylose ; à titre de donneur pour les glucose oxydases, on peut citer le D-glucose ; à titre de donneur pour les glycérol oxydases, on peut citer le  
20 glycérol et la dihydroxyacétone ; à titre de donneur pour les lactate oxydases, on peut citer l'acide lactique et ses sels ; à titre de donneur pour les pyruvate oxydases, on peut citer l'acide pyruvique et ses sels ; à titre de donneur pour les uricases, on peut citer l'acide urique et ses sels ; à titre de donneur pour les choline oxydases, on peut citer la choline et ses sels d'addition d'un acide  
25 comme le chlorhydrate de choline, et la bétaine aldéhyde ; à titre de donneur pour les sarcosine oxydases, on peut citer la sarcosine, la N-méthyl-L-leucine, la N-méthyl-DL-alanine, et la N-méthyl-DL-valine ; et enfin, à titre de donneur pour les bilirubine oxydases, on peut citer la bilirubine.

30 Le donneur n'est pas obligatoirement encapsulé avec l'enzyme. Il est de préférence ajouté dans le milieu cosmétique extérieur aux microcapsules. Il diffuse alors à travers la membrane polymérique des microcapsules vers l'intérieur de celles-ci où il est transformé sous l'effet conjugué de l'enzyme et de l'oxygène. Si le donneur est encapsulé avec l'enzyme, il est clair que les

microcapsules d'enzymes devront être conditionnées à l'abri de l'oxygène (par exemple dans un dispositif aérosol), la réaction de formation du peroxyde d'hydrogène ne s'effectuant qu'après mise en contact avec l'oxygène de l'air. Le peroxyde d'hydrogène formé lors de cette réaction diffuse en sens inverse de l'intérieur des microcapsules vers le milieu extérieur où il pourra jouer le rôle d'agent oxydant des précurseurs de colorants d'oxydation.

La ou les oxydo-réductases à 4 électrons encapsulées selon la présente invention sont notamment choisies parmi les laccases, les tyrosinases, les catéchol oxydases et les polyphénols oxydases.

La coloration peut s'effectuer par diffusion des précurseurs de colorants à travers l'enveloppe polymérique vers l'intérieur des microcapsules suivie de la rétrodiffusion des colorants oxydés, ou bien par l'intermédiaire d'un médiateur.

Les laccases peuvent notamment être choisies parmi les laccases d'origine végétale, d'origine animale, d'origine fongique (levures, moisissures, champignons) ou d'origine bactérienne, les organismes d'origine pouvant être mono- ou pluricellulaires. Les laccases peuvent également être obtenues par biotechnologie.

Parmi les laccases d'origine végétale utilisables selon l'invention, on peut citer les laccases produites par des végétaux effectuant la synthèse chlorophyllienne telles que celles indiquées dans la demande de brevet FR-A-2 694 018.

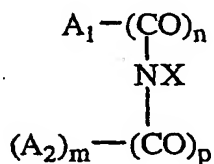
On peut notamment citer les laccases présentes dans les extraits d'Anacardiacees tels que par exemple les extraits de *Magnifera indica*, de *Schinus molle* ou de *Pleiogynium timoriense*; dans les extraits de Podocarpacees; de *Rosmarinus off.*; de *Solanum tuberosum*; d'*Iris sp.*; de *Coffea sp.*; de *Daucus carota*; de *Vinca minor*; de *Persea americana*; de *Catharethus roseus*; de *Musa sp.*; de *Malus pumila*; de *Gingko biloba*; de

*Monotropa hypopithys* (sucepin), d'*Aesculus* sp.; d'*Acer pseudoplatanus*; de *Prunus persica* et de *Pistacia palaestina*.

Parmi les laccases d'origine fongique, éventuellement obtenues par biotechnologie, utilisables selon l'invention, on peut citer la ou les laccases issues de *Polyporus versicolor*, de *Rhizoctonia praticola* et de *Rhus vernicifera* telles que décrites par exemples dans les demandes de brevet FR-A-2112549 et EP-A-504005; les laccases décrites dans les demandes de brevet WO 95/07988, WO 95/33836, WO 95/33837, WO 96/00290, WO 97/19998 et WO 97/19999, dont le contenu fait partie intégrante de la présente description comme par exemple la ou les laccases issues de *Scytalidium*, de *Polyporus pinsitus*, de *Myceliophthora thermophila*, de *Rhizoctonia solani*, de *Pyricularia orizae*, et leurs variantes. On peut également citer la ou les laccases issues de *Trametes versicolor*, de *Fomes fomentarius*, de *Chaetomium thermophile*, de *Neurospora crassa*, de *Colorius versicol*, de *Botrytis cinerea*, de *Rigidoporus lignosus*, de *Phellinus noxius*, de *Pleurotus ostreatus*, d'*Aspergillus nidulans*, de *Podospora anserina*, d'*Agaricus bisporus*, de *Ganoderma lucidum*, de *Glomerella cingulata*, de *Lactarius piperatus*, de *Russula delica*, d'*Heterobasidion annosum*, de *Thelephora terrestris*, de *Cladosporium cladosporioides*, de *Cerrena unicolor*, de *Coriolus hirsutus*, de *Ceriporiopsis subvermispora*, de *Coprinus cinereus*, de *Panaeolus papilionaceus*, de *Panaeolus sphinctrinus*, de *Schizophyllum commune*, de *Dichomitius squalens*, et de leurs variantes.

On choisira plus préférentiellement les laccases d'origine fongique, éventuellement obtenues par biotechnologie.

Les médiateurs peuvent par exemple être choisis parmi les composés de formule





dans laquelle

-  $A_1$  et  $A_2$ , identiques ou différents, représentent chacun

(a) un radical aliphatique saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, comportant de 1 à 30 atomes de carbone, éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux hydroxyle, halogéno, sulfo, carboxy, nitro ou phényle;

(b) un radical hétérocyclique comprenant de 1 à 4 hétéroatomes et de 5 à 10 chaînons éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alkyle en  $C_1$ - $C_4$ , halogéno, phényle, hydroxyle, ou aralkyle en  $C_7$ - $C_{10}$ ;

(c) un radical aromatique comprenant de 6 à 10 chaînons, éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alkyle en  $C_1$ - $C_4$ , halogéno, sulfo, carboxy, nitro, hydroxyle ou nitroso;

l'atome d'azote du groupement NX pouvant former avec les groupements  $A_1-(CO)_n$  et  $A_2-(CO)_p$  un hétérocycle comprenant de 5 à 18 chaînons, ledit hétérocycle pouvant ou non être substitué par un ou plusieurs radicaux alkyle en  $C_1$ - $C_4$ , hydroxyle, phényle, halogène, sulfo, carboxy ou nitro;

- X représente un groupement -OH, =O, =S,  $\rightarrow$ O ou  $\rightarrow$ S ;

- m, n et p, indépendamment les uns des autres, sont des nombres entiers égaux à 0 ou 1.

Parmi les médiateurs enzymatiques correspondant à la formule ci-dessus, on peut notamment citer l'hydroxylamine, la N,N-dipropylhydroxylamine, la N,N-diisopropylhydroxylamine, la phénylhydroxylamine, la N-acétylhydroxylamine, le 1-phényl-1H-1,2,3-triazole-1-oxyde, le 2,4,5-triphényl-2H-1,2,3-triazol-1-oxyde, le 1-hydroxybenzotriazole, l'acide 1-hydroxybenzotriazole-sulfonique, le 1-hydroxybenzimidazole, le N-hydroxyphtalimide, le N-hydroxysuccinimide, la quinoline-N-oxyde, l'isoquinoline-N-oxyde, la 1-hydroxypipéridine, l'acide violurique, la 4-hydroxy-3-nitrosocoumarine, l'acide 1,3-diméthyl-5-nitrosobarbiturique, le 1-nitroso-2-naphtol, l'acide 2-nitroso-1-naphtol-4-sulfonique, le 2-nitroso-1-naphtol, l'acide 1-nitroso-2-naphtol-3,6-disulfonique et le 2,4-dinitroso-1,3-dihydroxybenzène.

Le ou les médiateurs enzymatiques peuvent également être choisis parmi l'acide syringique et ses esters; l'acétosyringone; le syringaldéhyde; l'acide parahydroxycinnamique; la vanilline; la 7-hydroxycoumarine; le 2,4-dichlorophénol; le parahydroxybenzènesulfonate; le 2,2'-azino-bis-(3-éthyl-  
5 benzothiazoline-6-sulfonate); les phénothiazines telles que la 10-méthyl phénothiazine; les benzidines telles que la 3,3'-diméthylbenzidine; les dérivés aminés de l'acide 2-naphtalène-sulfonique; la L-tyrosine; l'acide férulique; l'acide caféique; l'acide chlorogénique; et l'acide sinapique.

10 Le médiateur sera soit encapsulé avec l'enzyme soit ajouté dans le milieu cosmétique à l'extérieur des microcapsules. Dans le premier cas, les microcapsules devront bien entendu être conservées à l'abri de l'air.

15 La ou les peroxydases encapsulées dans les microcapsules selon la présente invention peuvent notamment être choisies parmi les enzymes appartenant à la sous-classe 1.11.1 décrite dans l'ouvrage *Enzyme Nomenclature*, Academic Press Inc., 1984. Certaines d'entre elles nécessitent la présence d'un donneur pour fonctionner.

20 C'est le cas, en particulier des NADH peroxydases (1.11.1) [donneur = NADH], des acides gras peroxydases (1.11.1.3) [donneur = acide gras, par exemple palmitate], des NADPH peroxydases (1.11.1.2), [donneur = NADPH], des cytochrome-C peroxydases (1.11.1.5) [donneur = ferrocyclochrome C], des iodures peroxydases (1.11.1.8) [donneur = iodure],  
25 des chlorures peroxydases (1.11.1.10) [donneur = chlorure], des L-ascorbates peroxydases (1.11.1.11) [donneur = L-ascorbate]; des glutathion peroxydases (1.11.1.9) [donneur = glutathion].

30 D'autres peroxydases fonctionnent sans donneur autre que le colorant d'oxydation. Il en est ainsi des catalases (1.11.1.6) et des peroxydases simplex (1.11.1.7).

Toutes les peroxydases fonctionnent en présence de peroxyde d'hydrogène qui est apporté tel quel par ajout dans le milieu cosmétique

extérieur ou généré *in situ* par voie enzymatique, par exemple par une oxydases à 2 électrons coencapsulée, telle que celles décrites ci-dessus, en présence d'un donneur et d'oxygène.

5 Les peroxydases utilisées peuvent être d'origine végétale, animale, fongique ou bactérienne. Elles peuvent être également obtenues par biotechnologie.

10 Ainsi, les peroxydases peuvent par exemple être issues de la pomme, de l'abricot, de l'orge, du radis noir, de la betterave, du chou, de la carotte, du maïs, du coton, de l'ail, du raisin, de la menthe, de la rhubarbe, du soja, de l'épinard, du coprin, du lait de bovin, des microorganismes du type *Acetobacter peroxidans*, *Staphylococcus faecalis*, *Arthromyces ramosus*.

15 De la même manière que pour les oxydoréductases à 4 électrons, la coloration d'oxydation en présence de peroxydases peut se faire par diffusion des précurseurs de colorants à travers l'enveloppe vers l'intérieur des microcapsules et rétrodiffusion des colorants oxydés, ou bien par l'intermédiaire d'un médiateur choisi parmi ceux décrits ci-dessus.

20 Parmi les enzymes d'oxydo-réduction décrites ci-dessus, on préfère tout particulièrement les oxydo-réductases à 2 électrons, et parmi celles-ci l'uricase. L'uricase catalyse la transformation de l'acide urique en allantoiné en présence d'oxygène, cette réaction libérant du peroxyde d'hydrogène.

25 La quantité d'enzyme dans les microcapsules selon la présente invention peut être exprimée soit en termes de quantité de protéine soit en termes d'activité enzymatique.

30 Les microcapsules à enveloppe polymérique et à cœur aqueux de la présente invention contiennent de préférence de 1 à 30 % en poids, et en particulier de 2 à 20 % en poids d'enzyme d'oxydoréduction, rapporté au poids total des microcapsules (enveloppe + phase aqueuse interne + enzyme).

Lorsqu'on utilise des microcapsules déshydratées, l'enzyme d'oxydoréduction représente de préférence de 2 à 95 %, et en particulier de 5 à 70 % du poids total des microcapsules déshydratées.

5 L'activité enzymatique des microcapsules à enveloppe polymérique et à cœur aqueux de la présente invention est mesurée selon des méthodes spécifiques à l'enzyme encapsulée et exprimée en unités spécifiques.

10 Ainsi, l'activité enzymatique des microcapsules contenant des oxydo-réductases à 2 électrons, et en particulier de l'uricase, est déterminée par oxymétrie à l'aide d'un oxygraphe de la société Hansutech.

15 Une unité U d'oxydo-réductase à 2 électrons correspond à la quantité d'enzyme - ou de microcapsules contenant l'enzyme - catalysant la formation de 1  $\mu$ mole de  $H_2O_2$  par minute à un pH de 8,5 et à une température de 25 °C.

20 Les microcapsules à enveloppe polymérique et à cœur aqueux de la présente invention ont de préférence une activité enzymatique d'oxydo-réductase à 2 électrons comprise entre 500 et 10 000 U/g de microcapsules, de préférence entre 1000 et 5000 U/g de microcapsules.

25 Le cœur aqueux des microcapsules, c'est-à-dire la phase aqueuse interne encapsulée de l'émulsion primaire eau-dans-huile dans laquelle se trouve l'enzyme d'oxydo-réduction peut également contenir, à l'état dissous, un ou plusieurs polymères hydrosolubles et/ou un ou plusieurs polyols de faible masse moléculaire. Le rôle des polymères hydrosolubles est de stabiliser l'émulsion primaire. Les polyols ont pour fonction de stabiliser l'actif en diminuant l'activité en eau de la phase aqueuse interne encapsulée.

30 Les polymères hydrosolubles sont choisis notamment parmi le poly(alcool vinylique), la polyvinylpyrrolidone, la carboxyméthylcellulose, les poly(acide carboxylique) et les dérivés réticulés de ceux-ci, et les gommes naturelles telles que les xanthanes, l'amidon, l'alginate de sodium, les pectines, le chitosane, le guar, le caroube et le carraghénane. Ces polymères

hydrosolubles peuvent être présents à raison de 0,01 à 10 %, de préférence à raison de 0,1 à 5 % en poids rapporté au poids total de la phase aqueuse interne encapsulée.

5 Les polyols de faible masse moléculaire sont choisis par exemple parmi le glycérol et les alkylèneglycols en C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>, notamment le propylèneglycol et le pentylèneglycol, et peuvent être présents à raison de 10 % à 90 % en poids, de préférence à raison de 10 à 50 % en poids par rapport au poids total de la phase aqueuse interne encapsulée.

10 La taille et la structure interne des microcapsules dépend d'un très grand nombre de paramètres liés au procédé de fabrication, tels que la température, la vitesse d'agitation lors de l'émulsification, la nature chimique et les quantités respectives des différents composants hydrosolubles et organosolubles, la quantité d'agents stabilisants etc. L'homme du métier saura faire varier ces différents paramètres pour obtenir la morphologie de microcapsules recherchée.

15 Les microcapsules peuvent en particulier être univacuolaires ou multivacuolaires, c'est-à-dire l'enveloppe externe peut renfermer un seul compartiment de phase aqueuse ou bien la phase aqueuse interne peut être divisée en une multitude de compartiments séparés par des parois de même nature chimique que l'enveloppe externe. Ce phénomène se produit généralement lorsque l'émulsion multiple est particulièrement stable et donne d'excellents résultats d'encapsulation.

20 Le rapport en poids de la phase aqueuse interne encapsulée formant le coeur des microcapsules de la présente invention à la paroi de celles-ci est généralement compris entre 0,1/1 et 50/1 et de préférence entre 0,5/1 et 10/1.

30 Les microcapsules de la présente invention ont généralement un diamètre moyen compris entre 0,5 µm et 500 µm et plus particulièrement entre 1 µm et 100 µm.

La présente invention a également pour objet un procédé de fabrication des microcapsules à coeur aqueux contenant au moins une enzyme d'oxydoréduction et à enveloppe polymérique telles que décrites ci-dessus. Ce procédé est un procédé de microencapsulation par émulsion multiple-  
5 évaporation de solvant comportant les étapes successives suivantes :

(a) solubilisation ou dispersion dans une phase aqueuse d'au moins une enzyme d'oxydo-réduction choisie parmi les oxydo-reductases à 2 électrons, les oxydo-réductases à 4 électrons et les peroxydases,

(b) émulsification de la solution ou dispersion aqueuse obtenue dans  
10 l'étape (a) dans une solution d'au moins un polymère choisi parmi la polycaprolactone, le poly(3-hydroxybutyrate), le poly(éthylène adipate), les esters de cellulose et d'au moins un acide carboxylique en C<sub>1-4</sub>, de préférence des esters de cellulose mixtes de deux types d'acides carboxyliques, le poly(butylène adipate), les copolymères de styrène et d'anhydride maléique,  
15 les copolymères de styrène et d'acide acrylique, les terpolymères séquencés styrène-éthylène/butylène-styrène, les terpolymères séquencés styrène-éthylène/propylène-styrène, et les terpolymères d'éthylène, d'acétate de vinyle et d'anhydride maléique, dans un solvant organique non miscible à l'eau,

(c) émulsification de l'émulsion primaire eau-dans-huile obtenue dans  
20 l'étape (b) dans une solution aqueuse contenant de préférence un agent stabilisant de l'émulsion,

(d) élimination du solvant organique par évaporation donnant une suspension aqueuse de microcapsules, et éventuellement

(e) élimination partielle ou totale de l'eau.

25 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'étape (e) consiste en une déshydratation des microcapsules donnant une poudre de microcapsules. L'encapsulation des enzymes d'oxydoréduction sous cette forme anhydre augmente la stabilité des enzymes par rapport à une  
30 encapsulation dans des microcapsules ayant conservé leur phase aqueuse interne.

Le solvant organique non miscible à l'eau utilisé dans l'étape (b) est généralement choisi en fonction de son pouvoir solvant vis-à-vis du matériau

de la paroi, de sa solubilité dans l'eau qui doit être la plus faible possible et de son point d'ébullition qui est de préférence inférieur à 100 °C. On peut utiliser par exemple le dichlorométhane, le cyclohexane, l'heptane, le chloro-1-butane et l'acétate d'éthyle.

5

La stabilité de l'émulsion multiple est un facteur déterminant pour l'obtention de bons résultats d'encapsulation. En effet, une stabilité insuffisante de l'émulsion multiple entraînerait un mélange des phases aqueuses interne et externe et une fuite de l'enzyme hors des vésicules formées. Il est par conséquent fortement recommandé d'ajouter à la phase aqueuse continue de l'étape (c) un agent stabilisant de l'émulsion.

10

Des agents stabilisants polymériques appropriés sont connus dans la technique et peuvent être choisis par exemple parmi le poly(alcool vinylique), la polyvinylpyrrolidone, les copolymères hydrosolubles styrène-anhydride maléique, la carboxyméthylcellulose, l'amidon, le chitosane et l'acide polyacrylique.

15

Bien que l'utilisation d'un agent stabilisant polymérique soit préférable, on peut également utiliser à la place de celui-ci, des agents tensioactifs hydrosolubles.

20

On pourra également introduire dans la solution de solvant organique de l'étape (b) un agent tensio-actif afin d'améliorer la stabilité de l'émulsion primaire. L'homme du métier saura choisir le composé adéquat, comme par exemple des agents tensio-actifs de HLB (balance hydrophile-lipophile) inférieure à 10, tels que les esters de sorbitane et d'acides gras comme par exemple les polysorbates, les lécithines liposolubles, les monoglycérides d'acides gras, le PEG-30 dipolyhydrostéarate (ARLACEL® P135 de la société ICI), le cétyldiméthicone-copolyol (ABIL® EM90 de la société GOLDSCHMIDT) et le polydiméthylsiloxane oxyéthyléné (DC2-5695® de la société DOW CHEMICAL).

25

30

La suspension de microcapsules obtenue après évaporation du solvant organique peut être incorporée telle quelle dans une composition tinctoriale. Si on le souhaite, les microcapsules peuvent également être isolées à partir de la suspension aqueuse obtenue dans l'étape (d) par filtration et on peut les sécher par exemple par évaporation ou lyophilisation de manière à obtenir une poudre de microcapsules, qui peut ensuite être remise en suspension dans un milieu aqueux ou dans une composition tinctoriale.

La présente invention a également pour objet une composition de teinture d'oxydation contenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un précurseur de colorant d'oxydation choisi parmi les bases d'oxydation et/ou les coupleurs, et une quantité appropriée de microcapsules décrites ci-dessus à enveloppe polymérique et à cœur aqueux contenant au moins une enzyme d'oxydo-réduction choisie parmi les oxydo-reductases à 2 électrons, les oxydo-réductases à 4 électrons et les peroxydases.

Les microcapsules représentent de préférence de 0,01 % à 50 %, et en particulier de 0,1 à 30 % du poids total de la composition de teinture d'oxydation.

Comme indiqué ci-dessus, les colorants d'oxydation utilisables dans les compositions de teinture d'oxydation de la présente l'invention sont choisis parmi les bases d'oxydation et/ou les coupleurs.

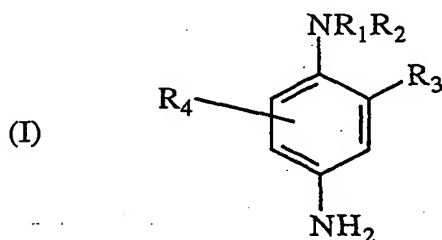
De préférence les compositions de teinture d'oxydation selon l'invention contiennent au moins une base d'oxydation.

Les bases d'oxydation utilisables dans les compositions de teinture d'oxydation de la présente invention sont choisies parmi celles classiquement connues en teinture d'oxydation. On peut notamment citer les ortho- et para-phénylènediamines, les bases doubles, les ortho- et para- aminophénols et les bases hétérocycliques ci-après, ainsi que leurs sels d'addition d'acide .

On peut citer en particulier :



(I) Les para-phénylènediamines de formule (I) et leurs sels d'addition d'acide :



5 dans laquelle:

$R_1$  représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en  $C_1-C_4$ , monohydroxyalkyle en  $C_1-C_4$ , polyhydroxyalkyle en  $C_2-C_4$ , alcoxy( $C_1-C_4$ )-alkyle( $C_1-C_4$ ), alkyle en  $C_1-C_4$  substitué par un groupement azoté, phényle ou 4'-aminophényle;

10  $R_2$  représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en  $C_1-C_4$ , monohydroxyalkyle en  $C_1-C_4$  ou polyhydroxyalkyle en  $C_2-C_4$ , alcoxy( $C_1-C_4$ )-alkyle( $C_1-C_4$ ) ou alkyle en  $C_1-C_4$  substitué par un groupement azoté ; ou

$R_1$  et  $R_2$  forment, avec l'atome d'azote qui les porte, un hétérocycle azoté à 5 ou 6 chaînons éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements alkyle, hydroxy ou uréido;

$R_3$  représente un atome d'hydrogène, un atome d'halogène tel qu'un atome de chlore, un radical alkyle en  $C_1-C_4$ , sulfo, carboxy, monohydroxyalkyle en  $C_1-C_4$  ou hydroxyalcoxy en  $C_1-C_4$ , acétylaminoalcoxy en  $C_1-C_4$ , mésylaminoalcoxy en  $C_1-C_4$  ou carbamoylaminoalcoxy en  $C_1-C_4$ ,

20  $R_4$  représente un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un radical alkyle en  $C_1-C_4$ .

Parmi les groupements azotés de la formule (I) ci-dessus, on peut citer notamment les radicaux amino, monoalkyl( $C_1-C_4$ )amino, dialkyl( $C_1-C_4$ )amino, trialkyl( $C_1-C_4$ )amino, monohydroxyalkyl( $C_1-C_4$ )amino, imidazolinium et ammonium.

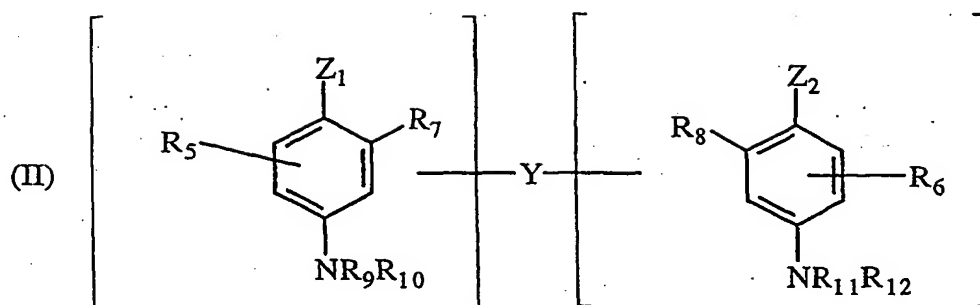
Parmi les paraphénylènediamines de formule (I) ci-dessus, on peut plus particulièrement citer la paraphénylènediamine, la paratoluylènediamine, la 2-chloroparaphénylènediamine, la 2,3-diméthyl-paraphénylènediamine, la

2,6-diméthylparaphénylènediamine, la 2,6-diéthyl-paraphénylènediamine, la 2,5-diméthylparaphénylènediamine, la N,N-diméthyl-paraphénylènediamine, la N,N-diéthylparaphénylènediamine, la N,N-dipropyl-paraphénylènediamine, la 4-amino-N,N-diéthyl-3-méthyl-aniline, la N,N-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-paraphénylènediamine, la 4-N,N-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)amino-2-méthyl-aniline, la 4-N,N-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-amino-2-chloro-aniline, la 2- $\beta$ -hydroxyéthyl-paraphénylènediamine, la 2-fluoro-paraphénylènediamine, la 2-isopropyl-paraphénylènediamine, la N-( $\beta$ -hydroxypropyl)-paraphénylènediamine, la 2-hydroxyméthyl-paraphénylènediamine, la N,N-diméthyl-3-méthylparaphénylènediamine, la N,N-(éthyl- $\beta$ -hydroxyéthyl)-paraphénylènediamine, la N-( $\beta,\gamma$ -dihydroxypropyl)-paraphénylènediamine, la N-(4'-aminophényl)-paraphénylènediamine, la N-phényl-paraphénylènediamine, la 2- $\beta$ -hydroxyéthoxy-paraphénylènediamine, la 2- $\beta$ -acétylaminoéthoxy-paraphénylènediamine, la N-( $\beta$ -méthoxyéthyl)paraphénylènediamine, la 2-méthyl-1-N- $\beta$ -hydroxyéthyl-paraphénylènediamine, et leurs sels d'addition d'acide.

Parmi les para-phénylènediamines de formule (I) ci-dessus, on préfère tout particulièrement la paraphénylènediamine, la paratoluyènediamine, la 2-isopropylparaphénylènediamine, la 2- $\beta$ -hydroxyéthyl-paraphénylènediamine, la 2- $\beta$ -hydroxyéthoxy-paraphénylènediamine, la 2,6-diméthyl-paraphénylène-diamine, la 2,6-diéthyl-paraphénylènediamine, la 2,3-diméthyl-paraphénylènediamine, la N,N-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-paraphénylènediamine, la 2-chloro-paraphénylènediamine, et leurs sels d'addition d'acide.

(II) Selon l'invention, on entend par bases doubles, les composés comportant au moins deux noyaux aromatiques sur lesquels sont fixés des groupements amino et/ou hydroxyle.

Parmi les bases doubles utilisables à titre de bases d'oxydation dans les compositions tinctoriales conformes à l'invention, on peut notamment citer les composés répondant à la formule (II) suivante, et leurs sels d'addition d'acide:



dans laquelle

- $Z_1$  et  $Z_2$ , identiques ou différents, représentent un radical hydroxyle ou - $\text{NH}_2$  éventuellement substitué par un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$  ou par un bras de liaison Y;
  - le bras de liaison Y représente une chaîne alkylène comportant de 1 à 14 atomes de carbone, linéaire ou ramifiée éventuellement interrompue ou terminée par un ou plusieurs groupements azotés et/ou par un ou plusieurs hétéroatomes tels que des atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote, et éventuellement substituée par un ou plusieurs radicaux hydroxyle ou alcoxy en  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ;
  - $R_5$  et  $R_6$  représentent indépendamment un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$ , monohydroxyalkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$ , polyhydroxyalkyle en  $\text{C}_2\text{-C}_4$ , aminoalkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$  ou un bras de liaison Y;
  - $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  et  $R_{12}$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un bras de liaison Y ou un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$ ;
- étant entendu que les composés de formule (II) ne comportent qu'un seul bras de liaison Y par molécule.

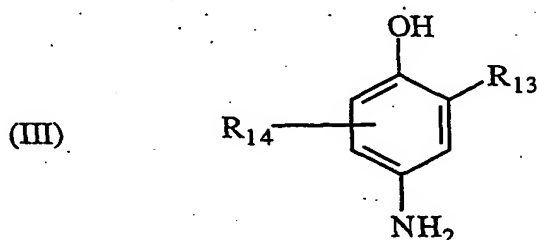
Parmi les groupements azotés de la formule (II) ci-dessus, on peut citer notamment les radicaux amino, monoalkyl( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )amino, dialkyl( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )amino, trialkyl( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )amino, monohydroxyalkyl( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )amino, imidazolinium et ammonium.

Parmi les bases doubles de formules (II) ci-dessus, on peut plus particulièrement citer le N,N'-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-N,N'-bis-(4'-aminophényl)-

1,3-diamino-propanol, la N,N'-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-N,N'-bis-(4'-amino-phényl)-éthylènediamine, la N,N'-bis-(4-aminophényl)-tétraméthylènediamine, la N,N'-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-N,N'-bis-(4-aminophényl)-tétraméthylènediamine, la N,N'-bis-(4-méthyl-aminophényl)-tétraméthylènediamine, la N,N'-bis-(éthyl)-N,N'-bis-(4'-amino-3'-méthylphényl)-éthylènediamine, le 1,8-bis-(2,5-diaminophénoxy)-3,5-dioxaoctane, et leurs sels d'addition d'acide.

Parmi ces bases doubles de formule (II), le N,N'-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-N,N'-bis(4'-aminophényl)-1,3-diamino-propanol, le 1,8-bis-(2,5-diaminophénoxy)-3,5-dioxaoctane ou l'un de leurs sels d'addition d'acide sont particulièrement préférés.

(III) les para-aminophénols répondant à la formule (III) suivante, et leurs sels d'addition avec un acide :



dans laquelle

$R_{13}$  représente un atome d'hydrogène, un atome d'halogène tel que le fluor, un radical alkyle en  $C_1$ - $C_4$ , monohydroxyalkyle en  $C_1$ - $C_4$ , alcoxy( $C_1$ - $C_4$ )alkyle( $C_1$ - $C_4$ ) ou aminoalkyle en  $C_1$ - $C_4$ , ou hydroxyalkyl( $C_1$ - $C_4$ )aminoalkyle en  $C_1$ - $C_4$ .

$R_{14}$  représente un atome d'hydrogène ou un atome d'halogène tel que le fluor, un radical alkyle en  $C_1$ - $C_4$ , monohydroxyalkyle en  $C_1$ - $C_4$ , polyhydroxyalkyle en  $C_2$ - $C_4$ , aminoalkyle en  $C_1$ - $C_4$ , cyanoalkyle en  $C_1$ - $C_4$  ou alcoxy( $C_1$ - $C_4$ )-alkyle( $C_1$ - $C_4$ ).

Parmi les para-aminophénols de formule (III) ci-dessus, on peut plus particulièrement citer le para-aminophénol, le 4-amino-3-méthyl-phénol, le 4-amino-3-fluoro-phénol, le 4-amino-3-hydroxyméthyl-phénol, le 4-amino-2-

méthyl-phénol, le 4-amino-2-hydroxyméthyl-phénol, le 4-amino-2-méthoxyméthyl-phénol, le 4-amino-2-aminométhyl-phénol, le 4-amino-2-( $\beta$ -hydroxyéthyl-aminométhyl)-phénol, et leurs sels d'addition d'acide.

5 (IV) Les ortho-aminophénols utilisables à titre de bases d'oxydation dans le cadre de la présente l'invention sont notamment choisis parmi le 2-amino-phénol, le 2-amino-1-hydroxy-5-méthyl-benzène, le 2-amino-1-hydroxy-6-méthyl-benzène, le 5-acétamido-2-amino-phénol, et leurs sels d'addition d'acide.

10

(V) Parmi les bases hétérocycliques utilisables à titre de bases d'oxydation dans les compositions tinctoriales conformes à l'invention, on peut plus particulièrement citer les dérivés pyridiniques, les dérivés pyrimidiniques ou pyrazolopyrimidiniques, les dérivés pyrazoliques, et leurs sels d'addition

15

Parmi les dérivés pyridiniques, on peut plus particulièrement citer les composés décrits par exemple dans les brevets GB 1 026 978 et GB 1 153 196, comme la 2,5-diaminopyridine, la 2-(4-méthoxyphényl)-amino-3-amino-pyridine, la 2,3-diamino-6-méthoxypyridine, la 2-( $\beta$ -méthoxyéthyl)-amino-3-amino-6-méthoxy pyridine, la 3,4-diamino-pyridine, et leurs sels d'addition d'acide.

20

Parmi les dérivés pyrimidiniques, on peut plus particulièrement citer les composés décrits par exemple dans les brevets allemand DE 2 359 399 ou japonais JP 88-169 571 et JP 91-10659 ou demandes de brevet WO 96/15765, comme la 2,4,5,6-tétra-aminopyrimidine, la 4-hydroxy-2,5,6-triaminopyrimidine, la 2-hydroxy-4,5,6-triaminopyrimidine, la 2,4-dihydroxy-5,6-diaminopyrimidine, la 2,5,6-triaminopyrimidine, et les dérivés pyrazolopyrimidiniques tels ceux mentionnés dans la demande de brevet FR-A-2 750 048 et parmi lesquels on peut citer la pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la 2,5-diméthylpyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,5-diamine ; la 2,7-diméthyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,5-diamine ; le 3-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-7-ol ; le 3-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-5-ol ; le 2-(3-amino-pyrazolo-[1,5-a]-

25

30

pyrimidin-7-ylamino)-éthanol ; le 2-(7-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-3-ylamino)-éthanol ; le 2-[(3-amino-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)-(2-hydroxy-éthyl)-amino]-éthanol ; le 2-[(7-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-3-yl)-(2-hydroxy-éthyl)-amino]-éthanol ; la 5,6-diméthylpyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la 2,6-diméthyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la 2,5,N7,N7-tetraméthyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la 3-amino-5-méthyl-7-imidazolylpropylamino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine ; et leurs sels d'addition d'acide et leurs formes tautomères, lorsqu'il existe un équilibre tautomérique.

10

15

20

25

Parmi les dérivés pyrazoliques, on peut plus particulièrement citer les composés décrits dans les brevets DE 3 843 892, DE 4 133 957 et demandes de brevet WO 94/08969, WO 94/08970, FR-A-2 733 749 et DE 195 43 988 comme le 4,5-diamino-1-méthylpyrazole, le 3,4-diamino-pyrazole, le 4,5-diamino-1-(4'-chlorobenzyl)-pyrazole, le 4,5-diamino-1,3-diméthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-méthyl-1-phénylpyrazole, le 4,5-diamino-1-méthyl-3-phénylpyrazole, le 4-amino-1,3-diméthyl-5-hydrazino-pyrazole, le 1-benzyl-4,5-diamino-3-méthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-tert-butyl-1-méthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-1-tert-butyl-3-méthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-1-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-3-méthylpyrazole, le 4,5-diamino-1-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-pyrazole, le 4,5-diamino-1-éthyl-3-méthylpyrazole, le 4,5-diamino-1-éthyl-3-(4'-méthoxyphényl)-pyrazole, le 4,5-diamino-1-éthyl-3-hydroxyméthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-hydroxyméthyl-1-méthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-hydroxyméthyl-1-isopropyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-méthyl-1-isopropylpyrazole, le 4-amino-5-(2'-aminoéthyl)-amino-1,3-diméthyl-pyrazole, le 3,4,5-triaminopyrazole, le 1-méthyl-3,4,5-triamino-pyrazole, le 3,5-diamino-1-méthyl-4-méthylaminopyrazole, le 3,5-diamino-4-( $\beta$ -hydroxyéthyl)amino-1-méthyl-pyrazole, et leurs sels d'addition d'acide.

30

Selon la présente invention, les bases d'oxydation représentent de préférence de 0,0005 à 12 % en poids environ du poids total de la composition de teinture d'oxydation et encore plus préférentiellement de 0,005 à 8 % en poids environ de ce poids.

Les coupleurs utilisables dans les compositions de teinture d'oxydation selon l'invention sont ceux classiquement utilisés dans le domaine des teintures d'oxydation des fibres capillaires, c'est-à-dire les méta-aminophénols, les méta-phénylènediamines, les métadiphénols, les naphthols et les coupleurs hétérocycliques tels que par exemple les dérivés indoliques, les dérivés indoliniques, le sésamol et ses dérivés, les dérivés pyridiniques, les dérivés pyrazolotriazoles, les pyrazolones, les indazoles, les benzimidazoles, les benzothiazoles, les benzoxazoles, les 1,3-benzodioxoles, les quinolines et leurs sels d'addition d'acide.

Ces coupleurs sont plus particulièrement choisis parmi le 2,4-diamino 1-( $\beta$ -hydroxyéthoxy)-benzène, le 2-méthyl-5-amino-phénol, le 5-N-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-amino-2-méthyl-phénol, le 3-amino-phénol, le 1,3-dihydroxy-benzène, le 1,3-dihydroxy-2-méthyl-benzène, le 4-chloro-1,3-dihydroxy-benzène, le 2-amino 4-( $\beta$ -hydroxyéthylamino)-1-méthoxy-benzène, le 1,3-diamino-benzène, le 1,3-bis-(2,4-diaminophénoxy)-propane, le sésamol, le 1-amino-2-méthoxy-4,5-méthylènedioxybenzène, l' $\alpha$ -naphthol, le 6-hydroxy-indole, le 4-hydroxy-indole, le 4-hydroxy-N-méthylindole, la 6-hydroxy-indoline, la 2,6-dihydroxy-4-méthyl-pyridine, la 1H-3-méthyl-pyrazol-5-one, la 1-phényl-3-méthyl-pyrazol-5-one, la 2-amino-3-hydroxypyridine, le 3,6-diméthyl-pyrazolo-[3,2-c]-1,2,4-triazole, le 2,6-diméthyl-pyrazolo-[1,5b]-1,2,4-triazole et leurs sels d'addition d'acide.

Lorsqu'ils sont présents, ces coupleurs représentent de préférence de 0,0001 à 10 % en poids du poids total de la composition, et encore plus préférentiellement de 0,005 à 5 % en poids.

D'une manière générale, les sels d'addition d'acide des bases d'oxydation et coupleurs sont notamment choisis parmi les chlorhydrates, les bromhydrates, les sulfates, les tartrates, les lactates et les acétates.

Comme indiqué ci-avant lors de la description des enzymes d'oxydo-réduction, les oxydo-réductases à 2 électrons ont besoin de la présence d'un donneur spécifique qui, de préférence, n'est pas encapsulé avec l'enzyme mais ajouté au milieu cosmétiquement acceptable. La concentration du ou des

donneurs spécifiques aux oxydo-réductases à deux électrons dans les compositions de teinture d'oxydation de la présente invention est de préférence comprise entre 0,01 et 20 %, et en particulier entre 0,1 et 5 % du poids total de la composition de teinture d'oxydation.

5

Lorsque l'enzyme d'oxydo-réduction est une peroxydase nécessitant pour son fonctionnement un donneur spécifique, celui-ci est présent dans les compositions de teinture d'oxydation à raison de 0,001 à 20 % en poids, rapporté au poids total de la composition.

10

Les médiateurs capables d'activer les oxydo-réductases à 4 électrons décrits ci-dessus, lorsqu'ils sont présents dans les compositions tinctoriales de la présente invention, représentent de préférence de 0,0001 à 5 % en poids, et plus préférentiellement de 0,005 à 5 % en poids, rapporté au poids total de la composition.

15

Les compositions peuvent également contenir des agents antioxydants. Ceux-ci peuvent être choisis en particulier parmi le sulfite de sodium, l'acide thioglycolique, l'acide thiolactique, le bisulfite de sodium, l'acide déhydroascorbique, l'hydroquinone, la 2-méthylhydroquinone, la tert-butylhydroquinone, la 3-méthyl-1-phényl-5-pyrazolone et l'acide homogentisique et sont généralement présents dans des proportions comprises entre environ 0,05 et 1,5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

25

Les composition peuvent également contenir des principes actifs cosmétiques et des adjuvants de formulation utilisés habituellement dans des compositions de teinture d'oxydation, tels que des agents conservateurs, des épaississants polymériques, des agents tensio-actifs cationiques, anioniques, non ioniques ou zwitterioniques, des colorants, des parfums, des charges, des vitamines ou des agents conditionneurs.

30

Les compositions peuvent se présenter sous des formes diverses, par exemple sous forme de liquide, de crème, de gel. Elles peuvent également être



conditionnées sous pression en flacon aérosol en présence d'un agent propulseur.

5 Le procédé de teinture d'oxydation des fibres kératiniques et en particulier des cheveux de la présente invention consiste à appliquer sur les fibres kératiniques une composition de teinture d'oxydation décrite ci-dessus, à laisser la composition en contact avec les fibres pendant un temps suffisant pour obtenir la coloration souhaitée, par exemple pendant une période comprise entre 10 minutes et 1 heure, à éliminer la composition de teinture par  
10 rinçage et lavage, puis à sécher les cheveux.

Dans un mode de réalisation du procédé de teinture d'oxydation des fibres kératiniques de la présente invention, les compositions de teinture d'oxydation sont préparées, immédiatement avant l'application, par  
15 introduction des microcapsules contenant les enzymes d'oxydoréduction selon la présente invention, dans une composition tinctoriale appropriée contenant, dans un support physiologiquement acceptable, au moins un précurseur de colorant d'oxydation choisi parmi les bases d'oxydation et/ou les coupleurs.

20 Les exemples suivants illustrent le procédé d'encapsulation d'enzymes d'oxydo-réduction et l'utilisation des microcapsules obtenues pour la teinture des cheveux.

### 25 Exemple 1

#### Encapsulation d'uricase par émulsification multiple-évaporation

On prépare une solution aqueuse d'uricase (activité enzymatique :  
20 000 U/g) à 25 % en poids et à pH 9. On émulsionne, pendant 5 minutes,  
30 10 ml de cette solution avec 50 ml de dichlorométhane contenant 5 % en poids d'acétopropionate de cellulose (CAP-482-0,5 Eastman Chemical Company) à l'aide d'un appareil homogénéisateur de type rotor-stator, en maintenant la température à une valeur inférieure à 25 °C.

L'émulsion primaire obtenue est dispersée pendant 20 minutes dans 500 ml d'une solution aqueuse contenant 1 % de poly(alcool vinylique) (Airvol® 203, Air Products Chemical Inc.) à l'aide d'un appareil d'homogénéisation de type rotor-stator ou à hélice. Pendant cette étape, on prend également soin de ne pas laisser la température de la dispersion dépasser une valeur de 25 °C.

On évapore ensuite le dichlorométhane à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi B-480) pendant 5 heures à 20 °C, sous une pression de 40 kPa (400 mbar). On obtient ainsi une suspension aqueuse de microcapsules ayant un diamètre moyen de 12 µm.

Pour déterminer le taux d'encapsulation, c'est-à-dire le rapport de la quantité d'enzyme retrouvée à l'intérieur des microcapsules à la quantité totale d'enzyme utilisée au départ, on dose l'uricase dans le milieu extérieur par spectrophotométrie UV-visible à une longueur d'onde de 280 nm.

Le taux d'encapsulation d'uricase trouvé est de 90 %.

Pour évaluer la capacité des microcapsules à retenir l'enzyme encapsulée sans la relarguer au cours du temps, on lave les microcapsules obtenues, on les remet en suspension dans de l'eau distillée et on maintient la dispersion pendant 2 heures sous forte agitation (1400 tours par minute). Le dosage spectrophotométrique à 280 nm met en évidence l'absence d'enzyme dans le milieu de suspension. L'uricase est par conséquent retenue efficacement dans les microcapsules.

Les microcapsules ainsi préparées peuvent être lyophilisées et redispersées dans un milieu aqueux. Les propriétés de rétention de l'enzyme par les microcapsules ne se trouvent pas dégradées par la lyophilisation.

Les microcapsules lyophilisées ont une activité enzymatique, mesurée par oxymétrie à l'aide d'un oxygraphe Hansutech après dispersion dans l'eau, d'environ  $2500 \pm 500$  U/g de microcapsules.

Le Tableau ci-dessous montre l'évolution au cours du temps de l'activité enzymatique d'une uricase encapsulée selon l'exemple 1 conservée à 25 °C ou à 45 °C en comparaison avec une quantité identique d'uricase non encapsulée conservée dans les mêmes conditions.

5

	activité enzymatique initiale	activité enzymatique. après 2 jours	activité enzymatique après 7 jours
uricase encapsulée de l'exemple 1 (conservation à 25 °C)	100 %	100 %	51 %
uricase non encapsulée (conservation à 25 °C)	100 %	46 %	11 %
uricase encapsulée de l'exemple 1 (conservation à 45 °C)	100 %	78 %	23 %
uricase non encapsulée (conservation à 45 °C)	100 %	11 %	0 %

On peut constater que l'encapsulation ralentit sensiblement la diminution de l'activité enzymatique de l'uricase au cours du temps.

10

15

**Exemple 2****Utilisation de microcapsules contenant de l'uricase pour la teinture d'oxydation des cheveux**

5

On prépare les deux compositions de teinture d'oxydation A et B ci-dessous contenant respectivement 20 000 U d'uricase encapsulée selon l'exemple 1 et 20 000 U d'uricase non encapsulée.

	<b>Composition A</b> (selon l'invention)	<b>Composition B</b> (comparative)
1,4-diaminobenzène	0,324 g	0,324 g
1-méthyl-2-hydroxy-4-aminobenzène	0,369 g	0,369 g
terpolymère acide méthacrylique/acrylate d'éthyle / méthacrylate de stéaryle oxyéthyléné	2,5 g	2,5 g
monooléate de polyglycérol	1 g	1 g
acide urique	1 g	1 g
N-acétyl-L-cystéine	0,1 g	0,1 g
2-amino-2-méthyl-1-propanol	qsp pH = 9,5	qsp pH = 9,5
microcapsules selon exemple 1	8 g	-
uricase non encapsulée	-	1 g
nombre d'unités d'activité uricase	= 20 000 U	= 20 000 U
eau	qsp 100 g	qsp 100 g

10

La coloration s'effectue sur des mèches naturelles contenant 90 % de cheveux blancs, avec un rapport de bain de 5, après mise en contact avec l'oxygène de l'air. Après un temps de pose de 30 minutes, on rince, on lave et on sèche les cheveux.

15

Les propriétés de coloration des compositions sont évaluées selon le système colorimétrique  $L^*a^*b^*$  dans lequel  $L^*$  correspond à l'intensité de la nuance,  $a^*$  la position de la nuance sur l'axe rouge/vert, et  $b^*$  à la position de la nuance sur l'axe bleu/jaune. Plus la valeur de  $L^*$  d'une nuance est élevée, plus la nuance est intense. Des nuances grises ont des valeurs  $a^*$  et  $b^*$  proches de zéro.

Les résultats de teinture obtenus avec les compositions A et B sont résumés dans le tableau ci-dessous.

	$L^*$	$a^*$	$b^*$
mèches teintes avec la composition A	29,44	12,72	1,86
mèches teintes avec la composition B	28,6	13,6	0,89

Ces résultats montrent que, pour une activité enzymatique équivalente, la composition de teinture d'oxydation selon la présente invention (Composition A) donne une intensité de nuance pratiquement équivalente ( $\Delta L^* < 1$ ) à celle d'une composition de teinture d'oxydation contenant l'enzyme d'oxydo-réduction non encapsulée.

On constate par ailleurs que la conservation au cours du temps du pouvoir tinctorial de la composition A est meilleure que pour la composition B.

Le procédé de coloration avec la composition A s'effectue dans de bonnes conditions d'innocuité.

## REVENDICATIONS

1. Microcapsules à coeur aqueux contenant au moins une enzyme d'oxydo-réduction choisie parmi les oxydo-reductases à 2 électrons, les oxydo-réductases à 4 électrons et les peroxydases, et à enveloppe polymérique constituée d'au moins un polymère choisi parmi la polycaprolactone, le poly(3-hydroxybutyrate), le poly(éthylène adipate), le poly(butylène adipate), les esters de cellulose et d'au moins un acide carboxylique en C<sub>1-4</sub>, les copolymères de styrène et d'anhydride maléique, les copolymères de styrène et d'acide acrylique, les terpolymères séquencés styrène-éthylène/butylène-styrène, les terpolymères séquencés styrène-éthylène/propylène-styrène, et les terpolymères d'éthylène, d'acétate de vinyle et d'anhydride maléique.

2. Microcapsules selon la revendication 1, caractérisées par le fait que l'enzyme est une oxydo-réductase à deux électrons choisie parmi les pyranose oxydases, les glucose oxydases, les glycérol oxydases, les lactate oxydases, les pyruvate oxydases, les uricases, les choline oxydases, les sarcosine oxydases, les bilirubine oxydases et aminoacides oxydases.

3. Microcapsules selon la revendication 2, caractérisées par le fait que l'oxydo-réductase à deux électrons est une uricase d'origine animale, microbiologique ou biotechnologique.

4. Microcapsules selon la revendication 2 ou 3, caractérisées par le fait qu'elles ont une activité enzymatique d'oxydo-réductase à 2 électrons comprise entre 500 et 10 000 U/g de microcapsules, de préférence entre 1000 et 5000 U/g de microcapsules.

5. Microcapsules selon la revendication 1, caractérisées par le fait que l'enzyme est une oxydo-réductase à 4 électrons choisie parmi les laccases, les tyrosinases, les catéchol oxydases et les polyphénols oxydases.

6. Microcapsules selon la revendication 1, caractérisées par le fait que l'enzyme est une peroxydase choisie parmi les peroxydases simplex et les catalases.

5 7. Microcapsules selon la revendication 1, caractérisées par le fait que l'enzyme est une peroxydase choisie parmi les NADH peroxydases, les acides gras peroxydases, les NADPH peroxydases, les cytochrome C peroxydases, les iodures peroxydases, les chlorures peroxydases, les L-ascorbates peroxydases et les glutathion peroxydases.

10 8. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que ladite enveloppe est constituée d'acétopropionate de cellulose.

15 9. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait qu'elles contiennent de 1 à 30 % en poids, et en particulier de 2 à 20 % en poids d'enzyme d'oxydo-réduction, rapporté au poids total des microcapsules

20 10. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que le coeur aqueux contient en outre un ou plusieurs polyols de faible masse moléculaire et/ou un ou plusieurs polymères hydrosolubles.

25 11. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que le rapport en poids de la phase aqueuse interne encapsulée formant le coeur des microcapsules à la paroi de celles-ci est compris entre 0,1/1 et 50/1 de préférence entre 0,5/1 et 10/1.

30 12. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait qu'elles ont un diamètre moyen compris entre 0,5  $\mu\text{m}$  et 500  $\mu\text{m}$ , de préférence entre 1  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$ .

13. Microcapsules anhydres obtenues par déshydratation des microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes.

5 14. Microcapsules anhydres selon la revendication 13, caractérisées par le fait qu'elles contiennent de 2 à 95 %, de préférence de 5 à 70 % en poids d'enzyme d'oxydoréduction.

15. Procédé de fabrication de microcapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, comportant les étapes successives suivantes

10 (a) solubilisation ou dispersion dans une phase aqueuse d'au moins une enzyme d'oxydo-réduction,

(b) émulsification de la solution ou dispersion aqueuse obtenue dans l'étape (a) dans une solution d'au moins un polymère choisi parmi la polycaprolactone, le poly(3-hydroxybutyrate), le poly(éthylène adipate), les esters de cellulose et d'au moins un acide carboxylique en C<sub>1-4</sub>, le poly(butylène adipate), les copolymères de styrène et d'anhydride maléique, les copolymères de styrène et d'acide acrylique, les terpolymères séquencés styrène-éthylène/butylène-styrène, les terpolymères séquencés styrène-éthylène/propylène-styrène, et les terpolymères d'éthylène, d'acétate de vinyle et d'anhydride maléique, dans un solvant organique non miscible à l'eau,

20 (c) émulsification de l'émulsion primaire eau-dans-huile obtenue dans l'étape (b) dans une solution aqueuse contenant de préférence un agent stabilisant de l'émulsion,

(d) élimination du solvant organique par évaporation donnant une suspension aqueuse de microcapsules, et éventuellement

25 (e) élimination partielle ou totale de l'eau, caractérisé par le fait que l'enzyme d'oxydo-réduction est choisie parmi les oxydo-reductases à 2 électrons, les oxydo-réductases à 4 électrons et les peroxydases.

30 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé par le fait que le solvant organique non miscible à l'eau utilisé dans l'étape (b) est choisi parmi le dichlorométhane, le cyclohexane, l'heptane, le chloro-1-butane et l'acétate d'éthyle.



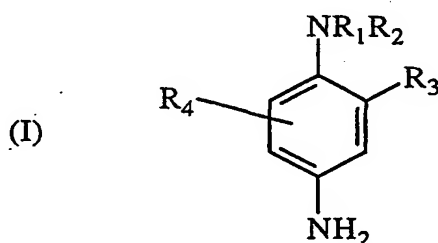
17. Procédé selon la revendication 15 ou 16, caractérisé par le fait que ledit agent stabilisant de l'émulsion utilisé dans l'étape (c) est choisi parmi le poly(alcool vinylique), la polyvinylpyrrolidone, les copolymères hydrosolubles styrène-anhydride maléique, la carboxyméthylcellulose, l'amidon, le chitosane et l'acide polyacrylique.

18. Composition de teinture d'oxydation des fibres kératiniques telles que les cheveux, contenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un précurseur de colorant d'oxydation choisi parmi les bases d'oxydation et/ou les coupleurs, caractérisée par le fait qu'elle contient des microcapsules à cœur aqueux et à enveloppe polymérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

19. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 18, caractérisée par le fait que lesdites microcapsules représentent de 0,01 % à 50 %, de préférence de 0,1 à 30 % du poids total de la composition de teinture d'oxydation.

20. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 18 ou 19, caractérisée par le fait que les bases d'oxydation sont choisies parmi les ortho- et para-phénylènediamines, les bases doubles, les ortho- et para-aminophénols et les bases hétérocycliques, ainsi que leurs sels d'addition d'acide.

21. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 20, caractérisée par le fait que les paraphénylènediamines sont choisies parmi celles de formule (I) et leurs sels d'addition d'acide :



dans laquelle:

$R_1$  représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en  $C_1-C_4$ , monohydroxyalkyle en  $C_1-C_4$ , polyhydroxyalkyle en  $C_2-C_4$ , alcoxy( $C_1-C_4$ )-alkyle( $C_1-C_4$ ), alkyle en  $C_1-C_4$  substitué par un groupement azoté, phényle ou 4'-aminophényle;

$R_2$  représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en  $C_1-C_4$ , monohydroxyalkyle en  $C_1-C_4$  ou polyhydroxyalkyle en  $C_2-C_4$ , alcoxy( $C_1-C_4$ )alkyle( $C_1-C_4$ ) ou alkyle en  $C_1-C_4$  substitué par un groupement azoté ; ou

$R_1$  et  $R_2$  forment, avec l'atome d'azote qui les porte, un hétérocycle azoté à 5 ou 6 chaînons éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements alkyle, hydroxy ou uréido;

$R_3$  représente un atome d'hydrogène, un atome d'halogène tel qu'un atome de chlore, un radical alkyle en  $C_1-C_4$ , sulfo, carboxy, monohydroxyalkyle en  $C_1-C_4$  ou hydroxyalcoxy en  $C_1-C_4$ , acétylaminoalcoxy en  $C_1-C_4$ , mésylaminoalcoxy en  $C_1-C_4$  ou carbamoylaminoalcoxy en  $C_1-C_4$ ,

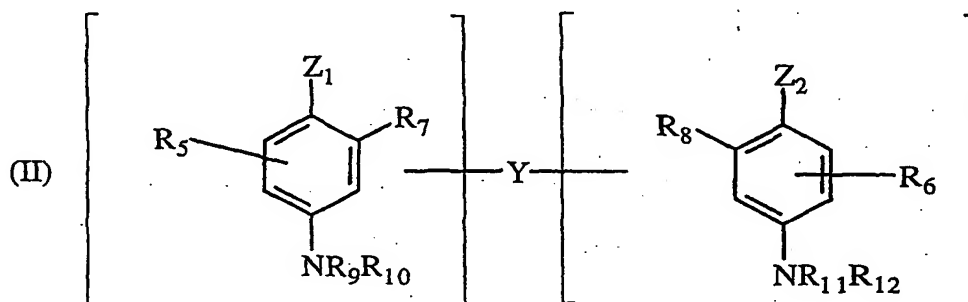
$R_4$  représente un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un radical alkyle en  $C_1-C_4$ .

22. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 21, caractérisée par le fait que les paraphénylènediamines sont choisies parmi la paraphénylènediamine, la paratoluylènediamine, la 2-chloroparaphénylènediamine, la 2,3-diméthyl-paraphénylènediamine, la 2,6-diméthylparaphénylènediamine, la 2,6-diéthyl-paraphénylènediamine, la 2,5-diméthylparaphénylènediamine, la N,N-diméthyl-paraphénylènediamine, la N,N-diéthylparaphénylènediamine, la N,N-dipropyl-paraphénylènediamine, la 4-amino-N,N-diéthyl-3-méthyl-aniline, la N,N-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-paraphénylènediamine, la 4-N,N-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)amino-2-méthyl-aniline, la 4-N,N-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-amino-2-chloro-aniline, la 2- $\beta$ -hydroxyéthyl-paraphénylènediamine, la 2-fluoro-paraphénylènediamine, la 2-isopropyl-paraphénylènediamine, la N-( $\beta$ -hydroxypropyl)-paraphénylènediamine, la 2-hydroxyméthyl-paraphénylènediamine, la N,N-diméthyl-3-méthylparaphénylènediamine, la N,N-(éthyl- $\beta$ -hydroxyéthyl)-paraphénylènediamine, la N-( $\beta,\gamma$ -dihydroxypropyl)-paraphénylènediamine, la N-(4'-aminophényl)-paraphénylènediamine, la N-phényl-paraphénylènediamine, la 2- $\beta$ -

hydroxyéthoxy-paraphénylènediamine, la 2-β-acétylaminoéthoxy-paraphénylènediamine, la N-(β-méthoxyéthyl)paraphénylènediamine, la 2-méthyl-1-N-β-hydroxyéthyl-paraphénylènediamine, et leurs sels d'addition d'acide.

5

23. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 20, caractérisée par le fait que les bases doubles sont choisies parmi les composés répondant à la formule (II) suivante, et leurs sels d'addition d'acide :



10

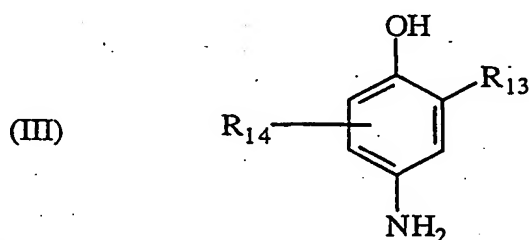
dans laquelle

- $Z_1$  et  $Z_2$ , identiques ou différents, représentent un radical hydroxyle ou - $\text{NH}_2$  éventuellement substitué par un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$  ou par un bras de liaison Y;
  - le bras de liaison Y représente une chaîne alkylène comportant de 1 à 14 atomes de carbone, linéaire ou ramifiée éventuellement interrompue ou terminée par un ou plusieurs groupements azotés et/ou par un ou plusieurs hétéroatomes tels que des atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote, et éventuellement substituée par un ou plusieurs radicaux hydroxyle ou alcoxy en  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ;
  - $R_5$  et  $R_6$  représentent indépendamment un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$ , monohydroxyalkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$ , polyhydroxyalkyle en  $\text{C}_2\text{-C}_4$ , aminoalkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$  ou un bras de liaison Y;
  - $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  et  $R_{12}$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un bras de liaison Y ou un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$ ;
- étant entendu que les composés de formule (II) ne comportent qu'un seul bras de liaison Y par molécule.

25

24. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 23, caractérisée par le fait que les bases doubles sont choisies parmi le N,N'-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-N,N'-bis-(4'-aminophényl)-1,3-diamino-propanol, la N,N'-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-N,N'-bis-(4'-amino-phényl)-éthylènediamine, la N,N'-bis-(4-aminophényl)-tétraméthylènediamine, la N,N'-bis-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-N,N'-bis-(4-aminophényl)-tétraméthylène-diamine, la N,N'-bis-(4-méthylaminophényl)-tétraméthylènediamine, la N,N'-bis-(éthyl)-N,N'-bis-(4'-amino-3'-méthylphényl)-éthylènediamine, le 1,8-bis-(2,5-diaminophénoxy)-3,5-dioxaoctane, et leurs sels d'addition d'acide.

25. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 20, caractérisé par le fait que les para-aminophénols sont choisis parmi ceux répondant à la formule (III) suivante, et leurs sels d'addition avec un acide :



dans laquelle

R<sub>13</sub> représente un atome d'hydrogène, un atome d'halogène tel que le fluor, un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, monohydroxyalkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxy(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyle(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) ou aminoalkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, ou hydroxyalkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)aminoalkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

R<sub>14</sub> représente un atome d'hydrogène ou un atome d'halogène tel que le fluor, un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, monohydroxyalkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, polyhydroxyalkyle en C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, aminoalkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, cyanoalkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ou alcoxy(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkyle(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>).

26. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 25, caractérisée par le fait que les para-aminophénols sont choisis parmi le para-aminophénol, le 4-amino-3-méthyl-phénol, le 4-amino-3-fluoro-phénol, le 4-amino-3-hydroxyméthyl-phénol, le 4-amino-2-méthyl-phénol, le 4-amino-2-

hydroxyméthyl-phénol, le 4-amino-2-méthoxyméthyl-phénol, le 4-amino-2-aminométhyl-phénol, le 4-amino-2-( $\beta$ -hydroxyéthyl-aminométhyl)-phénol, et leurs sels d'addition d'acide.

5           27. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 20, caractérisée par le fait que les ortho-aminophénols sont choisis parmi le 2-amino-phénol, le 2-amino-1-hydroxy-5-méthyl-benzène, le 2-amino-1-hydroxy-6-méthyl-benzène, le 5-acétamido-2-amino-phénol, et leurs sels d'addition d'acide.

10           28. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 20, caractérisée par le fait que les bases hétérocycliques sont choisies parmi les dérivés pyridiniques, les dérivés pyrimidiniques ou pyrazolopyrimidiniques, les dérivés pyrazoliques, et leurs sels d'addition d'acide.

15           29. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 28, caractérisée par le fait que les dérivés pyridiniques sont choisis parmi la 2,5-diaminopyridine, la 2-(4-méthoxyphényl)-amino-3-amino-pyridine, la 2,3-diamino-6-méthoxypyridine, la 2-( $\beta$ -méthoxyéthyl)-amino-3-amino-6-méthoxy pyridine, la 3,4-diamino-pyridine, et leurs sels d'addition d'acide.

20           30. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 28, caractérisée par le fait que les dérivés pyrimidiniques ou pyrazolopyrimidiniques sont choisis parmi la 2,4,5,6-tétra-aminopyrimidine, la 4-hydroxy-2,5,6-triaminopyrimidine, la 2-hydroxy-4,5,6-triaminopyrimidine, la 2,4-dihydroxy-5,6-diaminopyrimidine, la 2,5,6-triaminopyrimidine, la pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la 2,5-diméthylpyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,5-diamine ; la 2,7-diméthyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,5-diamine ; le 3-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-7-ol ; le 3-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-5-ol ; le 2-(3-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-7-ylamino)-éthanol ; le 2-(7-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-3-ylamino)-éthanol ; le 2-[(3-amino-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)-(2-hydroxy-éthyl)-amino]-éthanol ; le 2-[(7-amino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-3-yl)-(2-hydroxy-éthyl)-amino]-éthanol ; la 5,6-

diméthylpyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la 2,6-diméthyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la 2,5,N7,N7-tetraméthyl-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine-3,7-diamine ; la 3-amino-5-méthyl-7-imidazolylpropylamino-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine ; et leurs sels d'addition d'acide et leurs formes tautomères, lorsqu'il existe un équilibre tautomérique.

31. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 28, caractérisée par le fait que les dérivés pyrazoliques sont choisis parmi le 4,5-diamino-1-méthylpyrazole, le 3,4-diamino-pyrazole, le 4,5-diamino-1-(4'-chlorobenzyl)-pyrazole, le 4,5-diamino-1,3-diméthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-méthyl-1-phénylpyrazole, le 4,5-diamino-1-méthyl-3-phényl-pyrazole, le 4-amino-1,3-diméthyl-5-hydrazino-pyrazole, le 1-benzyl-4,5-diamino-3-méthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-tert-butyl-1-méthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-1-tert-butyl-3-méthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-1-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-3-méthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-1-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-pyrazole, le 4,5-diamino-1-éthyl-3-méthylpyrazole, le 4,5-diamino-1-éthyl-3-(4'-méthoxyphényl)-pyrazole, le 4,5-diamino-1-éthyl-3-hydroxyméthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-hydroxyméthyl-1-méthyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-hydroxyméthyl-1-isopropyl-pyrazole, le 4,5-diamino-3-méthyl-1-isopropylpyrazole, le 4-amino-5-(2'-aminoéthyl)-amino-1,3-diméthyl-pyrazole, le 3,4,5-triaminopyrazole, le 1-méthyl-3,4,5-triamino-pyrazole, le 3,5-diamino-1-méthyl-4-méthylaminopyrazole, le 3,5-diamino-4-( $\beta$ -hydroxyéthyl)amino-1-méthyl-pyrazole, et leurs sels d'addition d'acide.

32. Composition de teinture d'oxydation selon l'une quelconque des revendications 18 à 31, caractérisée par le fait que le ou les bases d'oxydation représentent de 0,0005 à 12 %, de préférence de 0,005 à 8 %, du poids total de la composition.

33. Composition de teinture d'oxydation selon l'une quelconque des revendications 18 à 32, caractérisée par le fait que le ou les coupleurs sont choisis parmi les méta-aminophénols, les méta-phénylènediamines, les métadiphénols, les naphthols et les coupleurs hétérocycliques tels que par exemple les dérivés indoliques, les dérivés indoliniques, le sésamol et ses

dérivés, les dérivés pyridiniques, les dérivés pyrazolotriazoles, les pyrazolones, les indazoles, les benzimidazoles, les benzothiazoles, les benzoxazoles, les 1,3-benzodioxoles, les quinolines et leurs sels d'addition d'acide.

5           34. Composition de teinture d'oxydation selon la revendication 33, caractérisée par le fait que le ou les coupleurs sont choisis parmi le 2,4-diamino 1-( $\beta$ -hydroxyéthoxy)-benzène, le 2-méthyl-5-amino-phénol, le 5-N-( $\beta$ -hydroxyéthyl)-amino-2-méthyl-phénol, le 3-amino-phénol, le 1,3-dihydroxy-benzène, le 1,3-dihydroxy-2-méthyl-benzène, le 4-chloro-1,3-dihydroxy-benzène, le 2-amino 4-( $\beta$ -hydroxyéthylamino)-1-méthoxy-benzène, 10 le 1,3-diamino-benzène, le 1,3-bis-(2,4-diaminophénoxy)-propane, le sésamol, le 1-amino-2-méthoxy-4,5-méthylènedioxybenzène, l' $\alpha$ -naphtol, le 6-hydroxy-indole, le 4-hydroxy-indole, le 4-hydroxy-N-méthylindole, la 6-hydroxy-indoline, la 2,6-dihydroxy-4-méthyl-pyridine, la 1H-3-méthyl-pyrazol-5-one, 15 la 1-phényl-3-méthyl-pyrazol-5-one, la 2-amino-3-hydroxypyridine, le 3,6-diméthyl-pyrazolo-[3,2-c]-1,2,4-triazole, le 2,6-diméthyl-pyrazolo-[1,5b]-1,2,4-triazole et leurs sels d'addition d'acide.

20           35. Composition de teinture d'oxydation selon l'une quelconque des revendications 18 à 34, caractérisée par le fait que le ou les coupleurs représentent de 0,0001 % à 10 %, de préférence de 0,005 à 5 % du poids total de la composition.

25           36. Composition de teinture d'oxydation selon l'une quelconque des revendications 18 à 36, caractérisée par le fait que, lorsque l'enzyme d'oxydo-réduction encapsulée est une oxydo-réductase à 2 électrons, la composition contient de 0,01 à 20 % en poids, de préférence de 0,1 à 5 % en poids rapporté au poids total de la composition de teinture d'oxydation, d'un donneur pour 30 ladite oxydo-réductase à 2 électrons.

37. Composition de teinture d'oxydation selon l'une quelconque des revendications 18 à 35, caractérisée par le fait que, lorsque l'enzyme d'oxydo-réduction encapsulée est une peroxydase nécessitant pour son fonctionnement

un donneur spécifique, celui-ci est présent à raison de 0,001 à 20 % en poids, rapporté au poids total de la composition.

5 38. Composition de teinture d'oxydation selon l'une quelconque des revendications 18 à 35, caractérisée par le fait que, lorsque l'enzyme d'oxydo-réduction encapsulée est une oxydo-réductase à 4 électrons, la composition contient de 0,0001 à 5 % en poids, de préférence de 0,005 à 5 % en poids, rapporté au poids total de la composition, d'un ou de plusieurs médiateurs capables d'activer ladite oxydo-réductase à 4 électrons.

10

39. Kit de teinture d'oxydation multicomposants comprenant au moins un premier composant contenant des microcapsules à cœur aqueux et à enveloppe polymérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, et au moins un deuxième composant contenant au moins un précurseur de colorant d'oxydation choisi parmi les bases d'oxydation et/ou les coupleurs, les deux composants étant conservés séparément et étant destinés à être mélangés l'un avec l'autre immédiatement avant application sur les fibres kératiniques.

15

40. Procédé de teinture d'oxydation des fibres kératiniques et en particulier des cheveux consistant à appliquer sur les fibres une composition de teinture d'oxydation selon l'une quelconque des revendications 18 à 38, ou une composition de teinture d'oxydation préparée, immédiatement avant application, par mélange des deux composants du kit de teinture d'oxydation selon la revendication 39, à laisser la composition en présence d'air en contact avec les fibres pendant un temps suffisant pour obtenir la coloration souhaitée, à éliminer la composition de teinture par rinçage et lavage, puis à sécher les cheveux.

20

25



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/FR 02/00704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K7/13 A61K7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	EP 1 086 684 A (OREAL) 28 March 2001 (2001-03-28) claim 1; examples 1,2	1-14, 18-40
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199145 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 1991-329184 XP002187496 & JP 03 220115 A (KIYOHARA R), 27 September 1991 (1991-09-27) abstract	1,18
A	EP 1 062 937 A (OREAL) 27 December 2000 (2000-12-27) examples	1-14, 18-40

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 July 2002

Date of mailing of the international search report

17/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Couckuyt, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern — Application No

PCT/FR 02/00704

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 87 07838 A (BIO SERAE SARL) 30 December 1987 (1987-12-30) claims -----	1, 15, 18
A	WO 98 28975 A (ZENECA LTD) 9 July 1998 (1998-07-09) examples -----	1, 15, 18
A	DD 218 734 A (AKAD WISSENSCHAFTEN DDR) 13 February 1985 (1985-02-13) claims -----	1, 15, 18
A	FR 2 773 472 A (OREAL) 16 July 1999 (1999-07-16) claims -----	1, 15, 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Interna      application No  
 PCT/FR 02/00704

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1086684	A	28-03-2001	FR 2798854 A1	30-03-2001
			AU 735052 B2	28-06-2001
			AU 5949100 A	29-03-2001
			BR 0004602 A	23-01-2001
			CN 1296812 A	30-05-2001
			EP 1086684 A1	28-03-2001
			JP 2001139441 A	22-05-2001
			PL 342704 A1	26-03-2001
JP 3220115	A	27-09-1991	JP 1934082 C	26-05-1995
			JP 6060089 B	10-08-1994
EP 1062937	A	27-12-2000	FR 2794972 A1	22-12-2000
			AU 3402700 A	15-02-2001
			BR 0001824 A	06-02-2001
			CA 2311277 A1	21-12-2000
			CN 1278427 A	03-01-2001
			EP 1062937 A1	27-12-2000
			JP 2001010940 A	16-01-2001
			PL 340868 A1	02-01-2001
WO 8707838	A	30-12-1987	FR 2600250 A1	24-12-1987
			AT 61224 T	15-03-1991
			CA 1326815 A1	08-02-1994
			DE 3768447 D1	11-04-1991
			EP 0270643 A1	15-06-1988
			ES 2009143 A6	01-09-1989
			WO 8707838 A1	30-12-1987
			US 4978528 A	18-12-1990
WO 9828975	A	09-07-1998	AU 732352 B2	26-04-2001
			AU 7887698 A	31-07-1998
			BR 9713652 A	11-04-2000
			CN 1245395 A	23-02-2000
			EP 1021085 A1	26-07-2000
			WO 9828975 A1	09-07-1998
			JP 2001508353 T	26-06-2001
			ZA 9711564 A	23-06-1998
DD 218734	A	13-02-1985	DD 218734 A4	13-02-1985
FR 2773472	A	16-07-1999	FR 2773472 A1	16-07-1999
			AU 729268 B2	01-02-2001
			AU 1974199 A	02-08-1999
			BR 9907141 A	31-10-2000
			CA 2317945 A1	22-07-1999
			CN 1292678 T	25-04-2001
			EP 1041957 A1	11-10-2000
			WO 9936045 A1	22-07-1999
			JP 2002509097 T	26-03-2002
			PL 341711 A1	23-04-2001

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den internationale No

PC... 02/00704

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 A61K7/13 A61K7/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	EP 1 086 684 A (OREAL) 28 mars 2001 (2001-03-28) revendication 1; exemples 1,2	1-14, 18-40
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199145 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 1991-329184 XP002187496 & JP 03 220115 A (KIYOHARA R), 27 septembre 1991 (1991-09-27) abrégé	1,18
A	EP 1 062 937 A (OREAL) 27 décembre 2000 (2000-12-27) exemples	1-14, 18-40



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 juillet 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/07/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5816 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Couckuyt, P

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem internationale No  
PCT/FR 02/00704

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 87 07838 A (BIO SERAE SARL) 30 décembre 1987 (1987-12-30) revendications	1, 15, 18
A	WO 98 28975 A (ZENECA LTD) 9 juillet 1998 (1998-07-09) exemples	1, 15, 18
A	DD 218 734 A (AKAD WISSENSCHAFTEN DDR) 13 février 1985 (1985-02-13) revendications	1, 15, 18
A	FR 2 773 472 A (OREAL) 16 juillet 1999 (1999-07-16) revendications	1, 15, 18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No  
PCT/FR 02/00704

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1086684	A	28-03-2001	FR 2798854 A1	30-03-2001
			AU 735052 B2	28-06-2001
			AU 5949100 A	29-03-2001
			BR 0004602 A	23-01-2001
			CN 1296812 A	30-05-2001
			EP 1086684 A1	28-03-2001
			JP 2001139441 A	22-05-2001
			PL 342704 A1	26-03-2001
JP 3220115	A	27-09-1991	JP 1934082 C	26-05-1995
			JP 6060089 B	10-08-1994
EP 1062937	A	27-12-2000	FR 2794972 A1	22-12-2000
			AU 3402700 A	15-02-2001
			BR 0001824 A	06-02-2001
			CA 2311277 A1	21-12-2000
			CN 1278427 A	03-01-2001
			EP 1062937 A1	27-12-2000
			JP 2001010940 A	16-01-2001
			PL 340868 A1	02-01-2001
WO 8707838	A	30-12-1987	FR 2600250 A1	24-12-1987
			AT 61224 T	15-03-1991
			CA 1326815 A1	08-02-1994
			DE 3768447 D1	11-04-1991
			EP 0270643 A1	15-06-1988
			ES 2009143 A6	01-09-1989
			WO 8707838 A1	30-12-1987
			US 4978528 A	18-12-1990
WO 9828975	A	09-07-1998	AU 732352 B2	26-04-2001
			AU 7887698 A	31-07-1998
			BR 9713652 A	11-04-2000
			CN 1245395 A	23-02-2000
			EP 1021085 A1	26-07-2000
			WO 9828975 A1	09-07-1998
			JP 2001508353 T	26-06-2001
			ZA 9711564 A	23-06-1998
DD 218734	A	13-02-1985	DD 218734 A4	13-02-1985
FR 2773472	A	16-07-1999	FR 2773472 A1	16-07-1999
			AU 729268 B2	01-02-2001
			AU 1974199 A	02-08-1999
			BR 9907141 A	31-10-2000
			CA 2317945 A1	22-07-1999
			CN 1292678 T	25-04-2001
			EP 1041957 A1	11-10-2000
			WO 9936045 A1	22-07-1999
			JP 2002509097 T	26-03-2002
			PL 341711 A1	23-04-2001